

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORLED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

{Exhibit 49}

**Stavrianopoulos et al., Japanese Patent 2,825,090,
issued November 18, 1998 (same family as US
4,994,373)**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2825090号

(45) 発行日 平成10年(1998)11月18日

(24) 登録日 平成10年(1998)9月11日

(51) IntCl⁶

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

発明の数4 (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願昭59-14165

(22) 出願日 昭和59年(1984)1月27日

(65) 公開番号 特開昭59-141599

(43) 公開日 昭和59年(1984)8月14日

審査請求日 平成3年(1991)1月26日

審判番号 平5-21881

審判請求日 平成5年(1993)11月24日

(31) 優先権主張番号 4 6 1 4 6 9

(32) 優先日 1988年1月27日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(73) 特許権者 999999999

エンソー バイオケム, インコーポレイ
ティド

アメリカ合衆国 10022 ニューヨーク、
ニューヨーク マディソン アヴェニュー
527

(72) 発明者 ジャニス シー、スタブリアノボロス
アメリカ合衆国 10019 ニューヨーク、
ニューヨーク ストリート 59 ウェス
ト 515

(74) 代理人 弁理士 宇佐見 忠男

合議体

審判長 酒井 雅英

審判官 佐伯 裕子

審判官 鈴木 恵理子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸検出に有用なキット、遺伝物質の存在を測定する方法、および可溶性信号を比色的もしくは光学的に検出もしくは測定するための装置

1

(57) 【特許請求の範囲】

1. (i) 基材と

(ii) 液体または溶液と

(iii) 該基材に直接的または間接的に固定または不動化されている検出対象核酸と、該核酸にハイブリダイゼーションされている一個または二個以上の信号部分からなる一個または二個以上の非放射性的化学的ラベルされたヌクレオチドプローブとからなり二重鎖オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドと

からなる該液体または溶液を保持することが出来る透明または半透明な非多孔性システムからなるキットであって、該キットは該非多孔性システム内において該基材に直接的または間接的に固定または不動化されている該二重鎖オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドに該液体または溶液を接触させることによって該二重鎖オリゴ

10

2

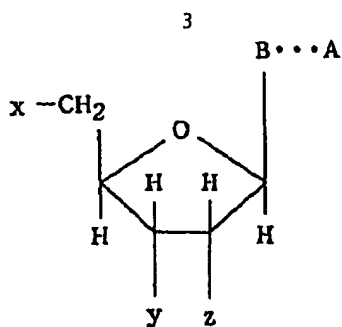
ヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの該ヌクレオチドプローブから発信されそして該液体または溶液中に溶出し拡散する可溶性信号を検出することによって該検出対象のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを検出するために使用されることを特徴とする核酸検出に有用なキット。

2. 該基材はガラス又は他の珪酸系物質である特許請求の範囲1に記載のキット。

3. 該化学的にラベルされているヌクレオチドは構造式

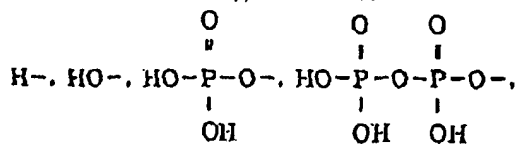
(2)

特許2825090



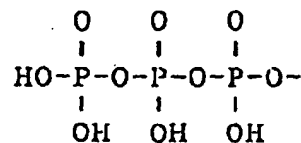
ここにBは糖部分のC'-位置に共有結合されたプリン、7-デアザプリンまたはピリミジン部分を表し、Bがプリンまたは7-デアザプリンの時、Bは該プリンまたはデアザプリンのN'-位置に結合され、Bがピリミジンの時、該BはN'-位置に結合されるものと規定せられ、Aは本化合物が二重鎖構造のリボ核酸、デオキシリボ核酸複合体、またはDNA-RNAハイブリッド中に入入れられた時、ポリペプチドと共に検知され得る錯体を形成することのできる少なくとも3個の炭素原子からなる部分を表し、点線はBとAとからなる鎖また群を表し、もしBが*20

4
* プリンであれば該鎖は該プリンの8-位置に結合され、もしBが7-デアザプリンであれば該鎖は該デアザプリンの7-位置に結合され、そしてもしBがピリミジンであれば該鎖は該ピリミジンの5-位置に結合されるものと規定せられ、そしてx,yおよびzの各々は



10

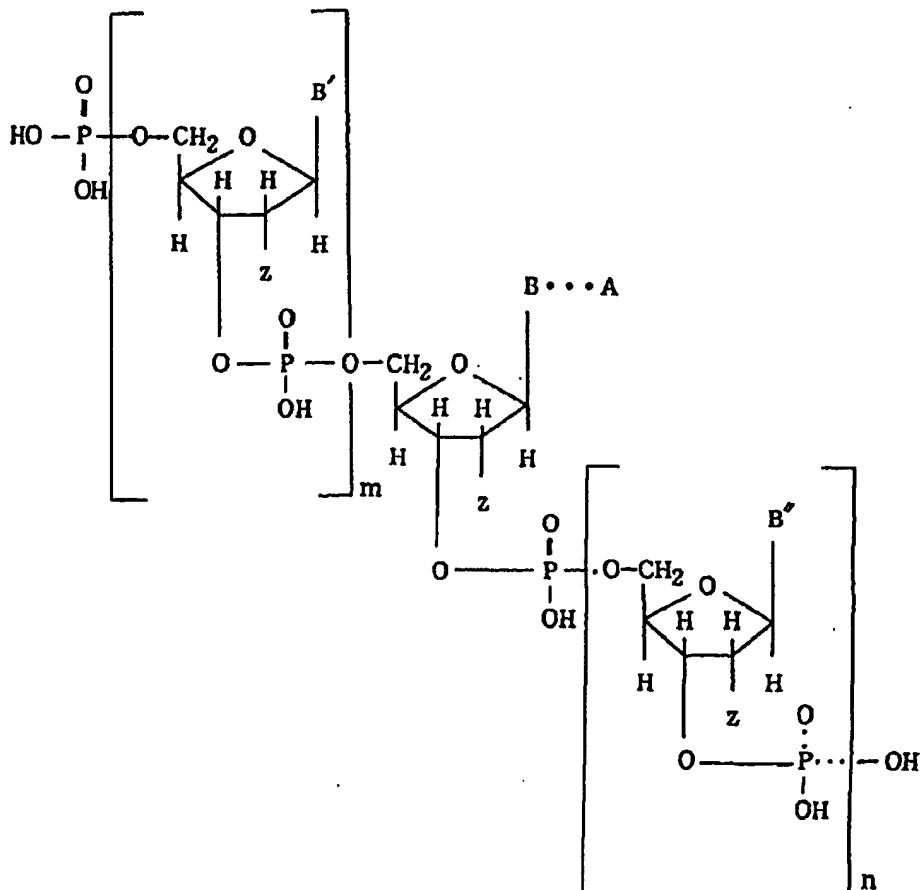
または



を表す。

を有する化合物である特許請求の範囲1に記載のキット。

4. 該化学的にラベルされているヌクレオチドは一般式



を有する。

ここにB,B'、およびB''の各々は糖部分のC'-位置に

共有結合されたプリン、デアザプリン、またはピリミジン部分を表し、B,B'、またはB''のいずれかがプリン

50

またはデアザブリンの時、Bは該ブリンまたはデアザブリンのN'-位置に結合され、B、B'、またはB''のいずれかがピリミジンの時、該BはN'-位置に存するものと規定せられ、Aは本化合物が対をなすリボ核酸またはデオキシリボ核酸分子によって形成される二重鎖構造の中に取り入れられたとき、ポリペプチドと共に検知され得る錯体を形成することの出来る少なくとも3個の炭素原子からなる部分を表し、点線はBとAとからなる化学鎖または群を表し、もし、Bがブリンであれば該Bは該ブリンの8-位置に結合され、もしBが7-デアザブリンであれば該鎖は該デアザブリンの7-位置に結合され、そしてもしBがピリミジンであれば該鎖はピリミジンの5-位置に存するものと規定せられ、zはH-またはHO-を表し、そしてmとnは0から約100,000までの整数を表す特許請求の範囲1に記載のキット。

5. 該基材はそれに付加される該二重鎖構造を有するポリヌクレオチドを含み、該二重鎖構造を有するポリヌクレオチドは該一重鎖をなす非放射性の化学的にラベルされているポリヌクレオチドもしくはヌクレオチドと、ラベルされていない一重鎖をなすポリヌクレオチドである他の鎖からなり、該基材は該他の一重鎖をなすラベルされていないポリヌクレオチドを該基材に固定し、それから該ラベルされていないポリヌクレオチドと該化学的にラベルされているポリヌクレオチドもしくはヌクレオチドを含む該一つの鎖とをハイブリッド化することによって調製せられる特許請求の範囲1に記載のキット。

6. 該一重鎖をなす非放射性の化学的にラベルされているポリヌクレオチドは該二重鎖構造を有するポリヌクレオチドの他のラベルされていない一重鎖をなすポリヌクレオチドを構成する塩基と実質的に対になる少なくとも25個の塩基を含む特許請求の範囲1に記載のキット。

7. 該化学的にラベルされているポリヌクレオチドはポリペプチドと連結もしくは結合されているポリヌクレオチドである特許請求の範囲1に記載のキット。

8. 該化学的にラベルされているポリヌクレオチドはポリペプチドと連結もしくは結合せられているポリヌクレオチドであり、該ポリペプチドは該ポリヌクレオチドに末端的にリグイションされる特許請求の範囲1に記載のキット。

9. 該化学的にラベルされているポリヌクレオチドはアミノ酸もしくは共有結合せられるSiq化学部分からなるポリペプチドからなるかもしくはそれを結合し、そして該Siq化学部分はそれ自身が信号することが出来るかもしくはそれ自身が自己探知出来るかもしくはその存在が知られ得る特許請求の範囲1に記載のキット。

10. 該Siq化学部分はサッカライド化合物からなる特許請求の範囲9に記載のキット。

11. 該Siq化学部分はコエンザイムを含む特許請求の範囲9に記載のキット。

12. 該コエンザイムはチアミンピロホスフェイト、フ

ラビンモノヌクレオチド、フラビンアデニンジヌクレオチド、ニコチナミドアデニンジヌクレオチド、ニコチナミドアデニンジヌクレオチドホスフェイト、コエンザイムA、ピリドキシルホスフェイト、ビオチン、テトラヒドロフォリクアシド、コエンザイムB₁₂、リボイックアシド、およびアスコルビクアシドからなる群から選択される特許請求の範囲11に記載のキット。

13. 該化学的にラベルされているポリヌクレオチドはモノサッカライドもしくは結合せられるSiq化学部分からなるポリサッカライドからなるかもしくはそれを結合し、該Siq化学部分はそれ自身が信号することが出来るかもしくはそれ自身が自己探知出来るかもしくはその存在が知られ得る特許請求の範囲1に記載のキット。

14. 該Siq化学部分はキレート試薬からなる特許請求の範囲13に記載のキット。

15. 該Siq化学部分はコエンザイムを含む特許請求の範囲13に記載のキット。

16. 該コエンザイムはチアミンピロホスフェイト、フラビンモノヌクレオチド、フラビンアデニンジヌクレオチド、ニコチナミドアデニンジヌクレオチド、ニコチナミドアデニンジヌクレオチドホスフェイト、コエンザイムA、ピリドキシルホスフェイト、ビオチン、テトラヒドロフォリクアシド、コエンザイムB₁₂、リボイックアシド、およびアスコルビクアシドからなる群から選択される特許請求の範囲15に記載のキット。

17. 該二重構造を有するポリヌクレオチドは二重鎖構造を有するポリリボヌクレオチドである特許請求の範囲1に記載のキット。

18. 該二重構造を有するポリヌクレオチドは二重鎖構造を有するポリデオキシリボヌクレオチドである特許請求の範囲1に記載のキット。

19. 該二重鎖構造を有するポリヌクレオチドは一つの鎖としてのポリデオキシリボヌクレオチドと、他の鎖としてのポリリボヌクレオチドとからなる特許請求の範囲1に記載のキット。

20. 該基材は透明でありそして該基材はその上に載置された該二重鎖構造を有するポリヌクレオチドの色調観察もしくは比色測定のために光がそれを透過するようにせられる特許請求の範囲1に記載のキット。

21. 該透明な基材はガラスである特許請求の範囲20に記載のキット。

22. 該基材は透明でありそして該基材はその上に載置された該二重鎖構造を有するポリヌクレオチドの色調観察もしくは比色測定のために光がそれを透過するようにせられる特許請求の範囲1に記載のキット。

23. 該基材はその中にウェルが設けられている平面状基材であり、該ウェルには該二重鎖構造を有するポリヌクレオチドが固定されている特許請求の範囲1に記載のキット。

24. その中のウェルに固定されている該二重鎖構造を

10

20

30

40

50

有するポリヌクレオチドを担持している該基材は該ウェルの中に固定されている二重鎖構造を有するポリヌクレオチドの光学的もしくは比色測定のために光がそれを透過するようにせられる特許請求の範囲23に記載のキット。

25. 該基材はプラスチック被覆された基材である特許請求の範囲1に記載のキット。

26. 該基材はガラス被覆された基材である特許請求の範囲1に記載のキット。

27. 該基材はプラスチック基材である特許請求の範囲1に記載のキット。

28. 該基材はポリスチレン基材である特許請求の範囲1に記載のキット。

29. 該基材はポリエチレン基材である特許請求の範囲1に記載のキット。

30. 該基材はポリプロピレン基材である特許請求の範囲1に記載のキット。

31. 該基材はセルロース基材である特許請求の範囲1に記載のキット。

32. 該基材はニトロセルロース基材である特許請求の範囲1に記載のキット。

33. 該基材はデキストラン基材である特許請求の範囲1に記載のキット。

34. 該基材はエポキシまたはエポキシ被覆基材である特許請求の範囲1に記載のキット。

35. 該基材はその表面に結合もしくは固定されているアミノ基を有する特許請求の範囲1に記載のキット。

36. 該基材はその上の負に電荷されている高分子電解質を固定もしくは不動化し得る表面を備えている特許請求の範囲1に記載のキット。

37. 該基材は一重鎖もしくは二重鎖構造を有するポリヌクレオチドを固定もしくは不動化し得るか、もしくは処理されていないか、もしくは非放射性的の化学的にラベルされているポリヌクレオチドを、該表面に固定されているラベルされていない一重鎖をなすポリヌクレオチドもしくはDNAとハイブリッド化せしめる表面を有する特許請求の範囲1に記載のキット。

38. 該基材はその表面に形成されたウェルの列もしくは凹部を有する平面形状の透明ガラス板であり、該ウェルもしくは凹部の表面は二重鎖構造を有するポリヌクレオチドを固定し、該二重鎖構造を有するヌクレオチドの一つの鎖は非放射性的の化学的にラベルされているポリヌクレオチドであるかもしくは該一つの鎖の一つのヌクレオチド成分としての非放射性的の化学的にラベルされているヌクレオチドからなる特許請求の範囲1に記載のキット。

39. 該基材は光が透過するに適した平面状表面を有するつば状体である特許請求の範囲1に記載のキット。

40. 該基材は該基材を垂直に光が透過するに適している特許請求の範囲1に記載のキット。

41. 該基材は系を水平に光が透過するに適している特許請求の範囲1に記載のキット。

42. 平面状壁部を有する透明ガラス容器もしくはつば状体を基材とし、該容器の内面には二重鎖構造を有するポリヌクレオチドが固定され、該二重鎖構造を有するポリヌクレオチドの一つの鎖は非放射性的の化学的にラベルされているポリヌクレオチドであるかもしくは該一つの鎖の一つのヌクレオチド成分としての非放射性的の化学的にラベルされているヌクレオチドからなる特許請求の範囲1に記載のキット。

43. 該基材はガラス表面を有し、該ガラス表面は硝酸水溶液の略沸点の温度でガラス表面を硝酸水溶液によって処理すること、得られた硝酸処理ガラス表面を洗浄してこのようにして処理されたガラス表面を乾燥した後ガンマアミノプロピルトリエトキシシランと接触せしめること、得られた処理ガラス表面を洗浄し乾燥すること、そしてDNA物質をそれに固定することからなることを特徴とするガラス表面に遺伝DNA物質を固定するための調製方法によって調製されている特許請求の範囲1に記載のキット。

44. 該基材は透明ガラス表面を有し、該ガラス表面には遺伝子DNA物質を固定するために適しておりそしてガラス表面にはアミノ基が結合もしくは固定されている特許請求の範囲1に記載のキット。

45. 複数個の基材を有し、各基材は二重鎖オリゴヌクレオチドあるいはポリヌクレオチドを直接または間接的に固定しており、該二重鎖ポリヌクレオチドのうちの一つは非放射性的の化学的にラベルされているヌクレオチドであるかまたは各鎖のヌクレオチド成分としての非放射性的の化学的にラベルされているヌクレオチドからなり、該非放射性的の化学的にラベルされているポリヌクレオチドまたはヌクレオチドは上記の二重鎖形状において該システム中の液体または溶液中に溶出し拡散する可溶性信号を発信する特許請求の範囲1に記載のキット。

46. 複数個の透明または半透明な非多孔性システムからなり、各システムは液体または溶液を保持することが出来、各システムにおいては基材に二重鎖オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが直接的または間接的に固定または不動化されており、該二重鎖オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのうちの一つは該可溶性信号を発信することの出来る一個または二個以上の信号部分を有する一個または二個以上の非放射性的の化学的にラベルされているヌクレオチドからなる特許請求の範囲1に記載のキット。

47. 該システムはウェル、チューブ、つば、および該ウェル、チューブ、またはつばの複数個からなる器具からなる組から選ばれている特許請求の範囲46に記載のキット。

48. 該キットは光度測定手法、分光光度測定手法、酵素結合免疫溶液検定手法、比色分析法、化学発光測定

手法、蛍光分析手法、および免疫蛍光分析手法からなる組から選ばれた手段によって可溶性信号を測定することが出来るかあるいは測定するために適したキットである特許請求の範囲46に記載のキット。

49. 該基材には、共有結合的に固定または不動化されている種々のそして知られている配列からなる拡散の鎖が配置されている特許請求の範囲1に記載のキット。

50. 選択した遺伝物質を変性して該遺伝物質から誘導される一重鎖を与えるために該選択された遺伝物質を含むサンプルを処理すること、得られた遺伝物質の一重鎖を表面に固定すること、ハイブリッド化条件の下にこのようにして固定された遺伝物質の一重鎖を測定されるべき該遺伝物質を特徴づけるヌクレオチド成分と実質的に対をなす非放射性的の化学的にラベルされているポリヌクレオチドプローブと接触せしめること、そして該ポリヌクレオチドプローブに液体または溶液を接触させ、該プローブから発信されそして該液体または溶液中に溶出し拡散する可溶性信号を検出することによって該遺伝物質の一重鎖と該非放射性的の化学的にラベルされているポリヌクレオチドプローブとの間に二重構造が形成されることを測定することからなることを特徴とする選択された遺伝物質の存在を測定する方法。

51. 該表面は透明な表面である特許請求の範囲50に記載の方法。

52. 該表面は半透明な表面である特許請求の範囲50に記載の方法。

53. 該表面はガラス表面である特許請求の範囲50に記載の方法。

54. 該表面はガラス表面であり、該一重鎖構造の遺伝物質は該表面に設けられたウェルに固定せられ、該表面が該一重鎖構造の遺伝物質と該ポリヌクレオチドプローブの間の二重構造の光学的もしくは比色測定のために光がそれを透過するようにせられる特許請求の範囲50に記載の方法。

55. 該一重鎖構造の遺伝物質と該非放射性的遺伝物質との間の該二重構造中、化学的にラベルされているポリヌクレオチドプローブは酵素が連結された免疫吸着材検定によって検出または測定される特許請求の範囲50に記載の方法。

56. 該遺伝物質の一重鎖と該非放射性的の化学的にラベルされているポリヌクレオチドプローブとによる二重構造形成の検出はポリヌクレオチドプローブ上に与えられる化学的ラベルとのコンプレックスの形成により行われ、該コンプレックスは分光測光的もしくは比色的手段によってその存在を信号するかもしくは明らかにすることが出来る成分からなる特許請求の範囲50に記載の方法。

57. 該遺伝物質の一重鎖と該非放射性的の化学的にラベルされているポリヌクレオチドプローブとの二重構造形成の検知は、該ポリヌクレオチドプローブ上に与えられ

る化学的ラベルによってコンプレックス-該コンプレックスは酵素よりなる-を形成すること、そして該ポリヌクレオチドプローブと結合せられる該酵素含有コンプレックスを該酵素と接触した時化学的もしくは色調的に変化を起こす基質との接触をもたらしことによって該化学的ラベルと結合せられる該酵素含有コンプレックスの存在を明らかにすることにより行われる特許請求の範囲50に記載の方法。

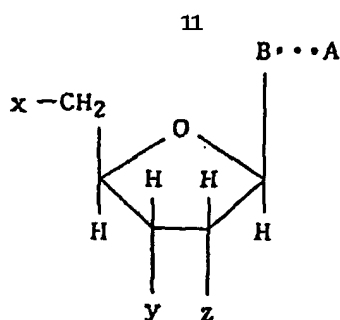
58. 二重構造もしくは二重鎖構造の形成、もしくは該物質の一重鎖と該非放射性的の化学的にラベルされているポリヌクレオチドプローブとのハイブリッド化は、二重構造形成の前もしくは後においてキレート試薬によって該ポリヌクレオチドプローブに結合せられた該化学的ラベルを用意すること、そして該キレート試薬を該キレート試薬と接触した時化学反応もしくは色調変化を生ずる基質と接触させることにより該キレート試薬の存在を明らかにすることによって測定される特許請求の範囲50に記載の方法。

59. 該キレート試薬の存在を明らかにすることは、該キレート試薬を該キレート試薬と接触した時化学反応を生ずる基質と接触させることにより測定される特許請求の範囲58に記載の方法。

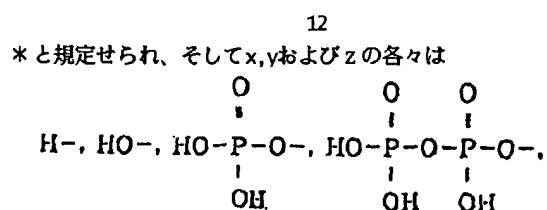
60. 該キレート試薬の存在を明らかにすることは、該キレート試薬を該キレート試薬と接触した時色調変化を生ずる基質と接触させることにより測定される特許請求の範囲58に記載の方法。

61. 該色調変化は光学的もしくは比色的に測定されそして結果として形成された二重構造に固定されるキレート試薬の量を表示する特許請求の範囲60に記載の方法。

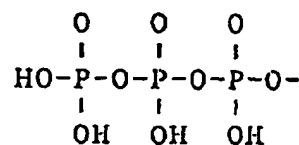
62. 病原菌を含んでいると思われる臨床的試料中の該病原菌の存在を検出する方法であり、該方法は不活性な透明もしくは半透明な支持体上に該試料を載置すること、該試料を処理して該試料中に存在する該病原菌のいずれかの遺伝物質を実質的に一重鎖として該支持体に付着させること、少なくとも25個の塩基を有し少なくとも該病原菌の構造的遺伝子を特徴づけるヌクレオチド鎖と実質的に対なるヌクレオチド鎖を有し、可溶性信号を発することの出来る非放射性的の化学的にラベルされているプローブに該固定された一重鎖をなす遺伝物質を接触させること-該化学的にラベルされているプローブはその中に化学的にラベルされているヌクレオチドを有し、該ヌクレオチドは構造式



ここにBは糖部分のC¹-位置に共有結合されたプリン、
7-デアザプリンまたはピリミジン部分を表し、Bがプ
リンまたは7-デアザプリンの時、Bは該プリンまたは
デアザプリンのN⁹-位置に結合され、Bがピリミジンの
時、該BはN¹-位置に結合されるものと規定せられ、A
は本化合物が二重鎖構造のリボ核酸、デオキシリボ核酸
複合体、またはDNA-RNAハイブリッド中に取り入れられた
時、ポリペプチドと共に検知され得る錯体を形成するこ
とのできる少なくとも3個の炭素原子からなる部分を表
し、点線はBとAとからなる鎖また群を表し、もしBが
プリンであれば該鎖は該プリンの8-位置に結合され、
もしBが7-デアザプリンであれば該鎖は該デアザプリ
ンの7-位置に結合され、そしてもしBがピリミジンで
あれば該鎖は該ピリミジンの5-位置に結合されるもの*



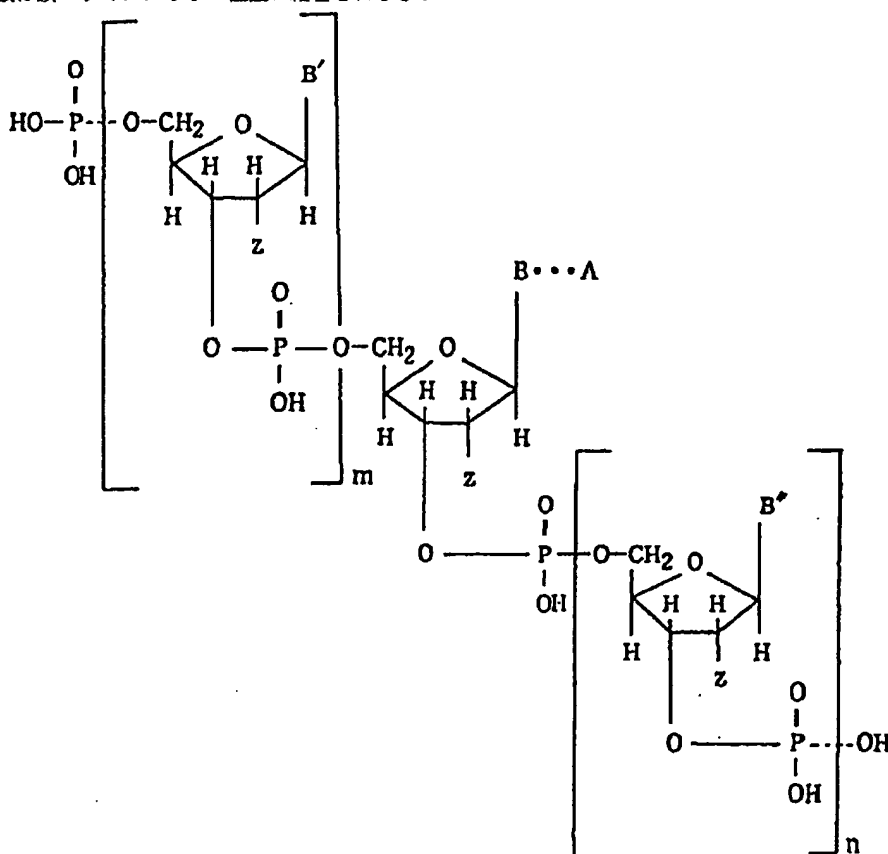
または



を表す。

を有する化合物であり、該接触は前もって定められた嚴重さでのハイブリッド化条件の下で行われる—そして該化学的にラベルされているプローブに液体または溶液を接触させ、該プローブから発信されそして該液体または溶液中に溶出した拡散する可溶性信号を検出することによって該支持体上での二重構造の形成を検出することからなることを特徴とする病原菌の存在を検出す方法。

63. 該化学的にラベルされているヌクレオチドは一般式



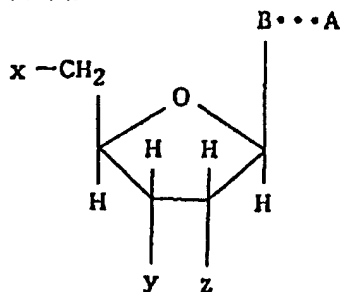
ここにB、B'、およびB''の各々は糖部分のC'-位置に共有結合されたプリン、デアザプリン、またはピリミジン部分を表し、B、B'、またはB''のいずれかがプリンまたはデアザプリンの時、Bは該プリンまたはデアザプリンのN'-位置に結合され、B、B'、またはB''のいずれかがピリミジンの時、該BはN'-位置に存するものと規定せられ、Aは本化合物が対をなすリボ核酸またはデオキシリボ核酸分子によって形成される二重鎖構造の中に取り入れられたとき、ポリペプチドと共に検知され得る錯体を形成することの出来る少なくとも3個の炭素原子からなる部分を表し、点線はBとAとからなる化学鎖または群を表し、もし、Bがプリンであれば該Bは該プリンの8-位置に結合され、もしBが7-デアザプリンであれば該鎖は該デアザプリンの7-位置に結合され、そしてもしBがピリミジンであれば該鎖はピリミジンの5-位置に存するものと規定せられ、zはH-またはHO-を表し、そしてmとnは0から約100,000までの整数を表す。

を有するものである特許請求の範囲62に記載の方法。

64. 該病原菌は連鎖球菌、ぶどう球菌、肺炎球菌、髄膜炎菌、サルモネラタイフイムリウス、クロストリジウムボツリヌスからなるグループから選ばれる特許請求の範囲62に記載の方法。

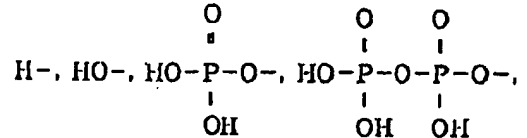
65. 不活性な透明もしくは半透明支持表面状に遺伝物質の試料を載置すること、該試料を処理して実質的に一重鎖形状で該支持体に該遺伝DNAをくっつけること、該固定された一重鎖をなす遺伝DNA物質を、少なくとも約25個の塩基の、少なくとも該遺伝DNA物質中に含まれるヌクレオチド連鎖と実質的に対をなすヌクレオチド連鎖を有する非放射性の化学的にラベルされているプローブと接触せしめること-該化学的にラベルされているプローブはその中に、該化学的にラベルされているヌクレオチドを有し、

該ヌクレオチドは

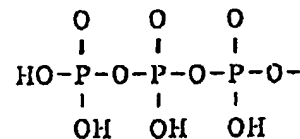


ここにBは糖部分のC'-位置に共有結合されたプリン、7-デアザプリンまたはピリミジン部分を表し、Bがプリンまたは7-デアザプリンの時、Bは該プリンまたはデアザプリンのN'-位置に結合され、Bがピリミジンの時、該BはN'-位置に結合されるものと規定せられ、Aは本化合物が二重鎖構造のリボ核酸、デオキシリボ核酸

複合体、またはDNA-RNAハイブリッド中に取り入れられた時、ポリペプチドと共に検知され得る錯体を形成することの出来る少なくとも3個の炭素原子からなる部分を表し、点線はBとAとからなる鎖また群を表し、もしBがプリンであれば該鎖は該プリンの8-位置に結合され、もしBが7-デアザプリンであれば該鎖は該デアザプリンの7-位置に結合され、そしてもしBがピリミジンであれば該鎖は該ピリミジンの5-位置に結合されるものと規定せられ、そしてx、yおよびzの各々は



または



を表す。

を有する化合物であり、該接触は前もって定められた厳重さでのハイブリッド化条件の下で行われる-そして該化学的にラベルされているプローブによって該支持体表面に固定されている該遺伝DNAの二重鎖形成を検出することからなることを特徴とする遺伝DNA物質の存在を検出もしくは同定する方法。

66. 対になる一重鎖DNA物質に対してハイブリッド化された化学的ラベルされている一重鎖DNAプローブを結合もしくは固定した基材-該化学的ラベルはそれに結合されている酵素コンプレックスを有する、

・透明または半透明な非多孔性システムにおいて該酵素コンプレックスと化学基質との間の反応によって色調変化もしくは光学的に検出可能な化学反応を起こすために該化学基質を添加して、該基材に結合もしくは固定せられている該ハイブリッド化された一重鎖DNAプローブの該化学的ラベルに結合されている該酵素コンプレックスに接触させるための手段、

・該酵素コンプレックスと該化学基質との接触により引き起こされ液体または溶液中に可溶性信号として溶出、拡散している該色調変化もしくは光学的に検出可能な化学反応を比色的もしくは光学的に検出するための手段からなる該色調変化もしくは化学反応を起こしている該酵素コンプレックスを含む該基材上に光を照射もしくは該基材を通して光を透過させるための手段、

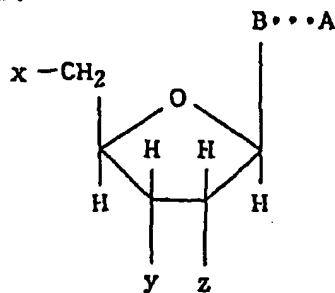
からなることを特徴とする色調変化もしくは化学反応である可溶性信号を比色的もしくは光学的に検出もしくは測定するための装置。

67. 該色調変化もしくは該化学反応を起こしている該酵素コンプレックスを含む該基材上に光を照射、もしくは

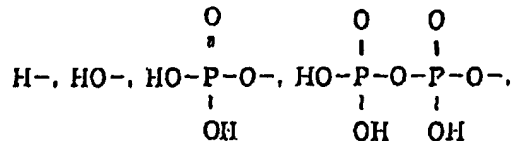
は該基材を通して光を透過せしめるための該手段は、該色調変化もしくは該光学的に検出可能な化学反応を定量的に測定するための手段を含む特許請求の範囲66に記載の装置。

68. 該化学的にラベルされているポリヌクレオチドはアミノ酸もしくは共有結合せられるSiq化学部分からなるポリペプチドからなるもしくはそれを結合し、そして該Siq部分はそれ自体が信号することが出来るかもしくはそれ自体が自己探知できるかもしくはその存在が知られ得る化学的にラベルされているポリヌクレオチドである特許請求の範囲66に記載の装置。

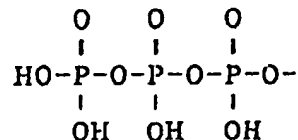
69. 該化学的にラベルされているポリヌクレオチドは、構造式



ここにBは糖部分のC-1位置に共有結合されたプリン、7-デアザプリンまたはピリミジン部分を表し、Bがプリンまたは7-デアザプリンの時、Bは該プリンまたはデアザプリンのN-1位置に結合され、Bがピリミジンの時、該BはN-1位置に結合されるものと規定せられ、Aは本化合物が二重鎖構造のリボ核酸、デオキシリボ核酸複合体、またはDNA-RNAハイブリッド中に取り入れられた時、ポリペプチドと共に検知され得る錯体を形成することのできる少なくとも3個の炭素原子からなる部分を表し、点線はBとAとからなる鎖また群を表し、もしBがプリンであれば該鎖は該プリンの8-位置に結合され、もしBが7-デアザプリンであれば該鎖は該デアザプリンの7-位置に結合され、そしてもしBがピリミジンであれば該鎖は該ピリミジンの5-位置に結合されるものと規定せられ、そしてx,yおよびzの各々は



または



を表す。

を有する化合物である特許請求の範囲66に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

例えばDNA遺伝物質のような遺伝物質の存在の測定もしくは同定において、該遺伝物質を変性して一重鎖をなすDNAもしくは一重鎖をなす遺伝物質を形成することが提案されている。該一重鎖をなす遺伝物質はその後固体支持体に固定され、そして例えばDNAプローブのような、その中に同定および/または測定せられるべき固定された遺伝物質の構造と対をなす塩基構造を有するプローブと接触せしめられる。該一重鎖をなすプローブによる該一重鎖をなす遺伝物質の接触は測定もしくは同定せられるべき該遺伝物質と該プローブとのハイブリッド化をもたらすための条件下で行われる。

例えば放射能的にラベルされた一重鎖をなすDNAプローブのような放射能的にラベルされているプローブが用いられて来た。米国特許第4,358,535号は臨床的試料中に存在する該遺伝物質を変性してその一重鎖をなす遺伝物質を形成し、そして病原菌を特徴づける結果として得られた一重鎖をなす遺伝物質を不活性支持体もしくは表面に固定することによる臨床的試料中の病原菌の存在を同定する方法を開示している。該病原菌を特徴づけるかもしくは同定することによって固定された一重鎖をなす遺伝物質は、ハイブリッド化条件下に放射性一重鎖をなすプローブとの接触をもたらされ、該病原菌と該プローブから誘導される該遺伝物質の二重構造もしくは二重鎖の形成をもたらす。該プローブと該病原菌遺伝物質との間の結果として形成された二重構造の存在はその後検知されそして該病原菌の存在および/または同定を確認するであろう。

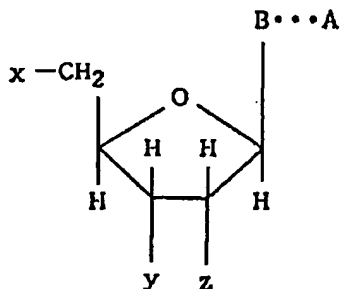
遺伝物質の同定のために例えば放射能的にラベルされたDNAプローブのような放射能的にラベルされているプローブを用いることの欠点は当業者にとってはよく知られていることである。かような欠点は放射性物質を取り扱う際に生ずる保護策や危険性のみならずかような放射性物質の寿命の短いことやかような放射能的にラベルされているDNAプローブの取扱や使用に関連しての費用高の点をも含むものである。

このような化合物が放射能的にラベルされている際に生ずる危険性および/または困難性を避けるために化学的にラベルされているヌクレオチドおよびポリヌクレオチドが知られている。例えば「ピオチンラベルされているポリヌクレオチドの酵素的合成：新しい核酸親和性プローブ」(Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 78, No. 11, p. 6632-6637, 1981, 11月)と題されたP. R. Langer, A. A. WalderおよびD. C. Wardにより論説においては、アリルアミン結合子腕を介してピリミジン環のC-5位置に結合せられるピオチン分子を含むdUTPおよびUTPの類似物が記載されている。該ピオチンラベルされているヌクレオチドは試験管的にはDNAおよびRNAポリメラーゼの変種に対しては効果的な基質である。低位のピオチン置換(キロ

塩基に対して50モルもしくはそれ以下)を含むポリヌクレオチドは置換されていない対照のそれらと同様な変性、再結合およびハイブリッド化特性を有する。ビオチンラベル化されたポリヌクレオチドは一重鎖および二重鎖構造の両者とも8M尿素、6M Guanidinium Hydrochlorideもしくは99%ホルムアミドによる大規模な洗浄の後でさえも選択的にそして容量的にアジピン-セファロース上に保持される。加うるに、ビオチンラベル化されているヌクレオチドはアンチビオチン抗体およびスタフィロコッカス アウレア、プロティンAの存在下において選択的に免疫学的沈殿されることが出来る。このようなビオチンラベル化されているポリヌクレオチドの特徴ある性質はそれらが特定のDNAおよびRNA連鎖の検知と同定のための有用な親和性のあるプローブであることを示唆している。該論説の主旨は米国特許出願中であると該論説中に示されている。

例えば二重鎖構造を有するDNAのようなDNAの中に編入され得、そして非放射性的に化学的にラベルされているDNAプローブの調製のために有用な化合物もしくはヌクレオチドがまた調製された。例えば1981年4月17日出願され共に継続中の米国特許出願第255,223号を参照のこと。該特許出願においては上記論説の主旨が開示され、そして更に次に述べるような化合物が開示されている。即ち

構造式

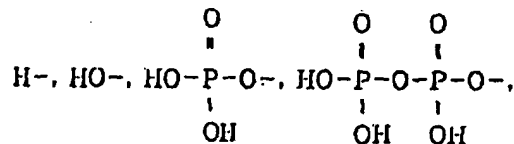


ここにBは糖部分のC'-位置に共有的に結合されたプリン、7-デアザプリンまたはピリミジン部分を表し、Bがプリンまたは7-デアザプリンの時、Bは該プリンま

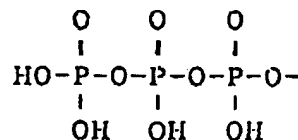
たはデアザプリンのN'-位置に結合され、Bがピリミジンの時、該BはN'-位置に結合されるものと規定せられ、Aは本化合物が二重鎖構造のリボ核酸、デオキシリボ核酸複合体、またはDNA-RNAハイブリッド中に取り入れられた時、ポリペプチドと共に検知され得る錯体を形成することの出来る少なくとも3個の炭素原子からなる部分を表し、

点線はBとAとからなる鎖また群を表し、もしBがプリンであれば該Bは該プリンの8-位置に結合、もしBが7-デアザプリンであれば該鎖は該デアザプリンの7-位置に結合され、そしてもしBがピリミジンであれば該鎖は該ピリミジンの5-位置に結合されるものと規定せられ、

そして、x,yおよびzの各々は



または



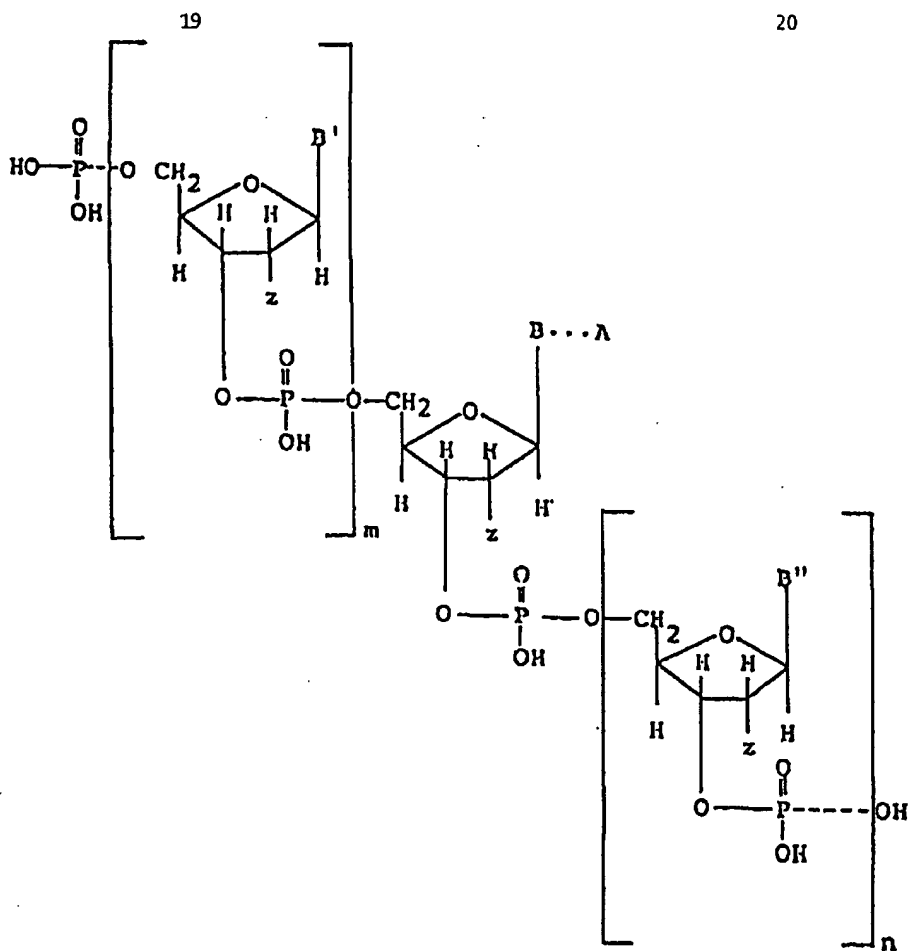
を表す。

を有する化合物で、該化合物は生物医学研究およびDNA再結合手法におけるプローブとして広く有用である。

この構造の範囲に包含される化合物のうち特に有用なものは更に次に示す特性の一つもしくはそれ以上を有する:Aは非芳香性である;Aは少なくともC₆である;BとAとからなる化学鎖は一つのα-オレフィン結合を含む;Aはビオチンもしくはイミノビオチンである;そしてBはピリミジンもしくは7-デアザプリンである。

米国特許出願第255,223号は又次の構造を有する化合物を開示している。即ち、

構造式



ここにB、B' およびB''の各々は糖部分のC¹-位置に共有的に結合されたブリン、デアザブリン、またはビリミジン部分を表し、B、B' またはB''のいずれかがブリンまたはデアザブリンの時、該結合は該ブリンまたはデアザブリンのN¹-位置に存し、B、B' またはB''のいずれかがビリミジンの時、該結合はN¹-位置に存するものと規定せられ、

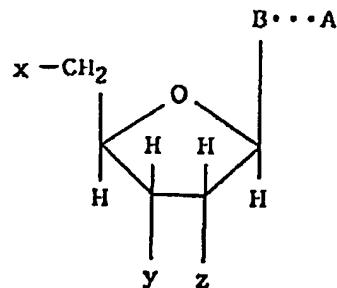
Aは本化合物が対をなすリボ核酸またはデオキシリボ核酸分子によって形成される二重鎖構造の中に取り入れられた時、ポリペプチドと共に検知され得る錯体を形成することの出来る少なくとも3個の炭素原子からなる部分を表し、点線はBとAとからなる化学鎖または組を表し、もしBがプリンであれば該鎖は該プリンの8-位置に結合され、もしBが7-デアザプリンであれば該鎖は該デアザプリンの7-位置に存し、そしてもしBがピリミジンであれば該鎖はピリミジンの5-位置に存するものと規定せられ、ZはH-またはHO-を表し、

そしてmとnは0から約100,000までの整数を表す。

これらの化合物は本発明の変性ヌクレオチドを含むヌクレオチドの混合物の酵素的集合によって調製されることが出来る。それとは別にオリゴーもしくはポリヌクレ

30 オチド中に存在するヌクレオチドは化学的方法を用いて変性され得るであろう。

上記に引用されたPNA論説中および上記に示された米国特許出願第255,223号中に記載されている化学的にラベルされもしくは変性されているヌクレオチドの構造は構造式

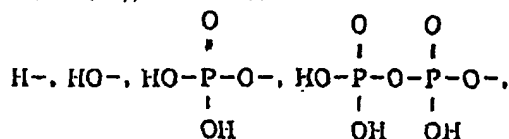


ここにBは糖部分のC⁴-位置に共有的に結合されたプリン、7-デアザプリンまたはピリミジン部分を表し、Bがプリンまたは7-デアザプリンの時、Bは該プリンまたはデアザプリンのN⁹-位置に結合され、Bがピリミジンの時、該BはおきN¹-位置に結合されるものと規定せられ、Aは本化合物が二重鎖構造のリガ核酸、デオキシ

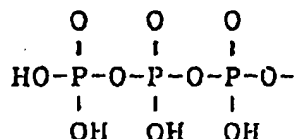
リボ核酸複合体、またはDNA-RNAハイブリッド中に取り入れられた時、ポリペプチドとともに検知され得る錯体を形成することの出来る少なくとも3個の炭素原子からなる部分を表し、

点線はBとAとからなる鎖または群を表し、もしBがプリンであれば該Bは該プリンの8-位置に結合、もしBが7-デアザプリンであれば該鎖は該デアザプリンの7-位置に結合され、そしてもしBがピリミジンであれば該鎖は該ピリミジンの5-位置に結合されるものと規定せられ、

そして、x,yおよびzの各々は



または



を表す。

を有する化合物で、該化合物は生物医学研究およびDNA組換え手法におけるプローブとして広く有用である。

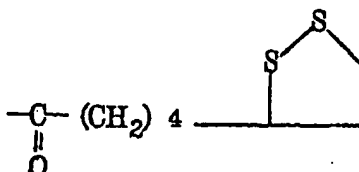
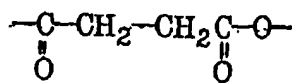
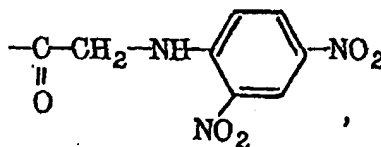
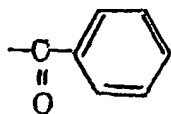
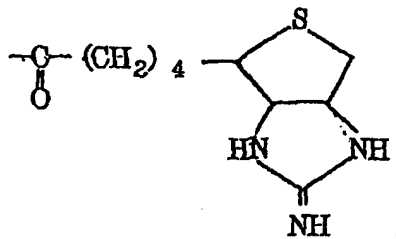
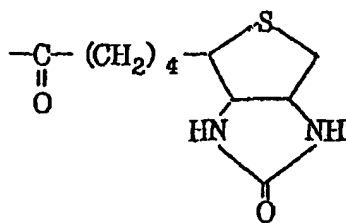
この構造式の範囲に包含されるすべての化合物は主と*

*して本発明の実施によって調製されそして使用されるであろうけれども、該化合物のいくらかのものより容易に調製されるもしくは/そして使用され、そしてそれ故に目下のところより望ましいものである。

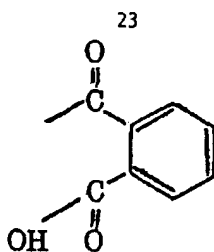
かくしてプリン、ピリミジン、および7-デアザプリンは主として有用なものであるけれども、ピリミジン、および7-デアザプリンはプリン8-位置置換体が該核酸をポリメラーゼ基材として無効にするから望ましいものである。かくして変性プリンはある点では有用であるけれどもピリミジンおよび7-デアザプリンほど一般的に有用ではない。更に本発明に有用なピリミジンおよび7-デアザプリンはそれぞれ5-もしくは7-位置に当置換されてはならない。結果として、チミン、5-メチルシトシン、および5-ハイドロキシメチルシトシンのようないくらかの塩基は有用でない。目下のところ有用な塩基はシトシン、ウラシル、デアザアデニンおよびデアザグアニンである。

Aは少なくとも三個の炭素原子を有し、そして変性ヌクレオチドがデオキシリボ核酸カリボ核酸かのいずれかに取り入れられた時ポリヌクレオチドと検出可能な錯体を形成し得るいかなる部分にも相当する。

Aはそれ故に適当な担体に付加した時単に免疫原的であるが、しかし適当な抗体と相互作用を行って錯体を形成し得るハプテンを含むこれら性質を有しているいかなるリガンドにも相当するであろう。有用であるこれら部分の例は次の通りである。



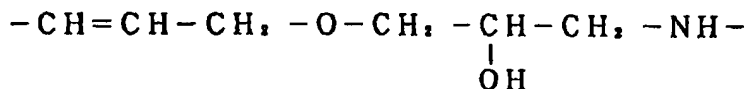
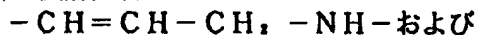
および



これら望ましいA部分としてはピオチン、およびイミノピオチンがある。

更に芳香性部分は塩基と対になっているらせん構造の中に介入せんとする傾向があるので、部分Aは非芳香性であることが望ましい。またより小さい部分はポリペプチドとの分子相互作用が充分でないから、充分な相互作用が起こって安定な錯体を形成せしめるためにはAは少なくともC₆であることが望ましい。ピオチンとイミノピオチンはこれら基準の両方を満足する。

AをBに結合させる鎖もしくは群は炭素-炭素一重結合、炭素-炭素二重結合、炭素-ニトロゲン一重結合、もしくは炭素-酸素一重結合を含むよく知られた結合の*

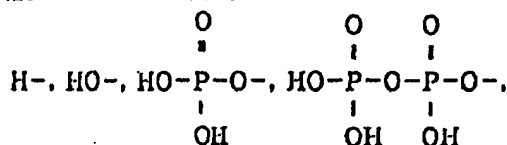


を有する。

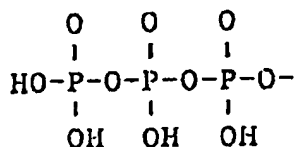
これらの鎖は望ましいものではあるけれども、特に例えばチオール、カルボン酸、およびエポキシド官能基のような他の変性可能な官能基を有するオレフィン結合手を含むその他のものも使用されることが出来る。

該鎖は特別な位置、即ちピリミジンの5-位置、プリン³⁰の8-位置、もしくはデアザプリンの7-位置に結合する。前に述べたように、プリンの8-位置の置換はここに検討されるすべての方法において有用な変性ヌクレオチドを形成しない。プリンの7-位置は窒素原子で占められているが、鎖が結びつく点になり得るであろう。しかしながら今日用いられそしてここに検討される化学的置換方法はこの目的には適していない。

記号x,yおよびzは糖部分5', 3' および2' 位置に結びついている基を表す。これらは



または



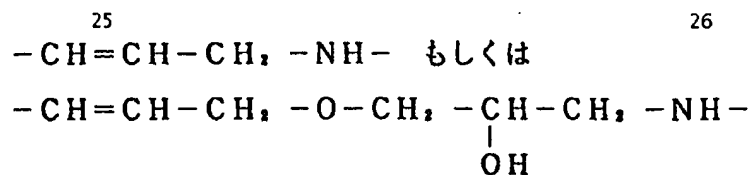
24

* いずれかを含む。しかしながら、化学鎖はBに関連してα-位置にオレフィン結合を含むことが一般的に望ましい。このようなα-オレフィン結合の存在は塩基が良く知られている二重鎖形状において他のものと対をなす時、部分Aが該塩基から離れた所に維持する役目を果たす。これはポリペプチドとの相互作用をより容易に行わしめ、それによって錯体の形成を促進せしめる。さらに大きな回転自由度を有する一重結合は必ずしもせんから該部分を充分離れた所に維持してポリペプチドによる認識およびポリペプチドとの錯体の形成を行わしめるわけではない。

化学鎖の鎖が第1級アミンから誘導され、そして-CH₂-NH-構造を有することは、このような化学結合が良く知られたアミン変性反応のいかなるものも利用して容易に形成されるからさらにより望ましいことである。アリルアミンおよびアリル-(3-アミノ-2-ヒドロキシ-1-プロピル) エーテル基から誘導される望ましい化学鎖の例はそれぞれ

のうちのいずれかである。

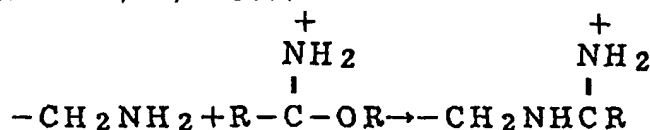
考えられ得ることではあるけれども、x,yおよびzのすべてが同時に同一のものであることはありそうにない。よりありそうなことは少なくともx,yおよびzのうち一つがモノ-、ジ-、もしくはトリ-ホスフェイトのいずれかのホスフェイト含有基であり、そして少なくとも一つがHO-もしくはH-であることである。容易に評価されるように、最もありそうなzの正体はそれぞれリボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチドを示しているHO-もしくはH-である。かようなヌクレオチドの例は5'-リボヌクレオチドモノホスフェイト, 5'-リボヌクレオチドジホスフェイト, 5'-リボヌクレオチドトリホスフェイト, 5'-デオキシリボヌクレオチドモノホスフェイト, 5'-デオキシリボヌクレオチドジホスフェイト, 5'-デオキシリボヌクレオチドトリホスフェイト, 5'-P-リボヌクレオチド3' P, および5'-P-デオキシリボヌクレオチド3' Pを含む、より特殊な例はAがピオチンもしくはイミノピオチン、化学鎖が



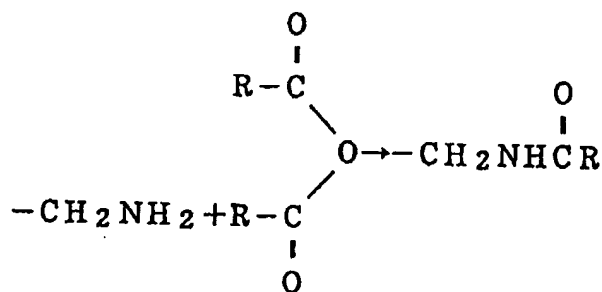
そしてBがウラシルもしくはシトシンであるこのタイプの変性ヌクレオチドを含む。

鎖手およびブローブ部分を塩基上へ導入するために採用せられる一般適合成方法は上記に検討せられる(J.L. RuthおよびD.E. Bergstrom, J. Org. Chem., 43, 2870, 1978; D.E. BergstromおよびM.K. Ogawa, J. Amer. Chem. Soc. 100, 8106, 1978; およびC.F. Bigge, P. Kalaritis, J. R. DeckおよびM.P. Mertes, J. Amer. Chem. Soc. 102, 2033, 1980をみよ) *

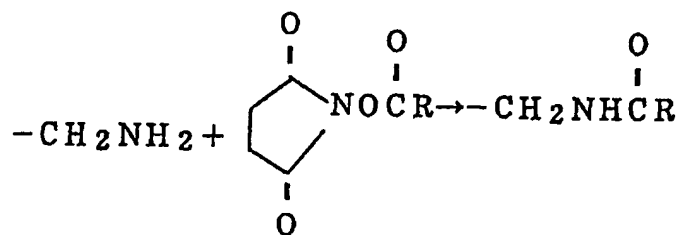
* しかしながら、ここに用いられるオレフィン置換体は以前には用いられたことがない。ブローブ部分Aの結びつきを容易にするために、たとえばアリルアミン [A]、もしくはアリル-(3-アミノ-2-ヒドロキシ-1-プロピル) エーテル [NACE] のような第一級アミン官能基を有するオレフィンを用いることが特に望ましいことが見出され、そして該オレフィン例えば



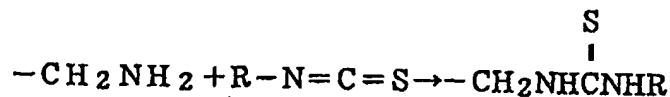
イミデート



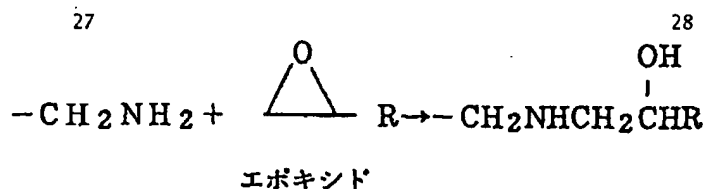
アンハイドライド



NHS-エステル (N-ヒドロキシサクシミド)



イソチオシアナート



のような標準的なアミン変性反応によってプローブを結びつけることを可能にする。

調製の容易さのために、NHS-エステルをプローブの付加のために用いることが望ましいことが見出されている。しかしながら、例えばチオール、カルボン酸、エポキシドのような他の変性可能な官能基を有するオレフィン鎖手もまた用いられることが出来る。更にまた、結合鎖手とプローブの両方共が望ましいと思われるならば単一段階において付加されることが出来る。

酵素基質として機能することが出来るヌクレオチド誘導体に直接結びつけられているピオチンプローブを有することは遂行され得る実験原案においても、分析のために利用され得る検出方法（顕微鏡的および非顕微鏡的）においてもかなり広範囲にわたる可能性を提供する。例えばピオチンヌクレオチドは細胞によって、もしくは粗細胞抽出物による合成過程に存在するポリヌクレオチドの中に導かれること出来、かくして発生期（成長期）のポリヌクレオチド鎖を検出および／または単離することを可能ならしめる。このような手順はいかなる直接化学的変性方法によってもすることが不可能である。更に、酵素は例えばピオチンのようなプローブをポリヌクレオチド中の高度に選択性のある、または位置特性のある配置の中へ導入するための試薬として用いられることが出来る。同様なプローブ変性生成物の化学的合成はどうみても達成することが甚だ困難であろう。

更に1982年8月23日出願され共に継続中であり、共に譲渡された米国特許出願第391,440号にはDNAもしくは他の核酸物質に結合されるかもしくは取り込まれるに適したヌクレオチドプローブの調製のための予備として、たとえばピリミジンの5-位置もしくはプリン7-位置において変性されているヌクレオチドである変性非放射性的化学的にラベルされているヌクレオチドが開示されている。このような変性ヌクレオチドの調製において、例えば核酸のようなヌクレオチドは好ましくは得られる変性ヌクレオチドが核酸の中へ取り込まれ得、いったん核酸の中へ取り込まれたならば該変性ヌクレオチドは該変性ヌクレオチドを含む結果として得られた核酸より形成される二重鎖構造の形成もしくは安定性を著しく妨害しないような非開裂方法で変性される。ヌクレオチドおよびこのように修飾されたヌクレオチドを取り込んだ核酸の非開裂的修飾は、できあがった開裂的に修飾されたヌクレオチドおよび同じものを含んだ核酸が然るべき二重鎖の形成を妨害するという点で、開裂的修飾と特徴づけられるヌクレオチドの修飾とは対照的である。本発明の

実施において、該ヌクレオチドは好ましくはピリミジンの5-位置もしくはプリンの7-位置において変性される。このような変性された該ヌクレオチドは非開裂的に変性されそしてこのようなヌクレオチドを含む核酸は二重鎖配置を形成することが出来る。

大まかには、本発明の実施の他の見地において、非開裂的方法でDNAの印付けもしくはラベル付けを行うためには種々の方法が有用である。たとえばピオチンはDNAもしくはRNA分子の末端に付加される。該ピオチンの付加にはリボヌクレオチドの付加が伴われる。3', 4' 隣接水酸基は過ヨウ素酸塩化によって酸化され、それからピオチンヒドラジドの存在において水素化ホウ素によって還元される。それに代わってカルボジイミドもまたピオチンをアルデヒド基に結合させるために用いることが出来る。

例えばDNAもしくはRNAのような核酸物質に印を付けるための他の手法はDNAもしくはRNA分子の末端に大きなマーカを付加することを含む。この手段の一つの例は一つの分子、例えばそのアミノ基がピオチンで標識されているリシルグリシンの付加である。他の例は上記に述べられた方法に従うことが出来るであろうが架橋剤としてカルボジイミドが用いられる。更にこの手法の他の例はピオチン化されたdA:dC二重鎖構造を有する重合体を生成し、そしてこの重合体を本発明によって調製されるプローブにリゲーションすることが出来るであろう。

非開裂的方法におけるDNAの標識のための他の手法はPS16もしくはファージに感染した細胞から5-位置にブトリシンもしくはスベルミジンを有するdPyTPを単離することを含む。所望ならばdPyTPはファージDNAから作られ、そしてdPyTPにホスホリル化され、次いで標識求核試薬によってポリアミン側鎖の変性が行われる。

非開裂的方法におけるDNAの標識のための他の手法はT4ファージグルコシル化酵素を用いてDNA中で5-ハイドロキシメチルシトシン（SHMC）にグルコースを付加し、次いでレクチンベースの検定によってスクリーニングすることを含む。

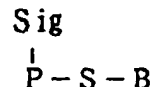
非開裂的方法におけるDNAの標識のための更に他の手法はT-4 DNAの加水分解し、次いで該SHCMPをSHMCTPへホスホリル化することを含む。SHMCTPはそれからポリメラーゼIを用いてDNAの中へ取り込まれる。かくしていかなるDNAもその中へSHMCを非開裂的に取り込むために変性されることが出来る。

穏やかな開裂方法におけるDNAに印を付けるための方法は核酸を二重鎖形状でたとえばベンゾビレンジオール

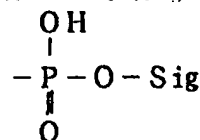
リッドの中へ該リボヌクレオチドを取り入れさせる部分である。

$$\begin{array}{c} \text{Sig} \\ | \\ \text{P} - \text{S} - \text{B} \end{array}$$

更に、本発明の実施にかかるヌクレオチドは式



ここにPは磷酸部分、Sは蔗糖部分、そしてBは塩基部分である。これら特殊なヌクレオチドにおいて、該P部分は該ヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドの場合にはS部分の3' および/または5' - 位置に結合せられ、該ヌクレオチドがリボヌクレオチドの場合には2' ,3' および/または5' - 位置に結合せられる。該塩基Bはプリンもしくはピリミジンのいずれかであり、該B部分がピリミジンもしくはプリンの場合には該B部分は蔗糖部分のN1位置もしくはN9-位置から1' - 位置までそれぞれ結合せられる。該Sidは化学鎖

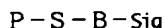


を介して該磷酸P部分に共有結合され、そして該Sigは該磷酸部分Pに結合せられた場合にはそれ自身が信号することが出来るかもしくはそれ自身が自己探知出来るかもしくはその存在が知られ得、そして望ましくは該ヌクレオチドは例えばDNA、RNAもしくはDNA-RNAハイブリッドのような二重鎖構造を有するポリヌクレオチドの中へ取り込まれ得、そしてその中にこのように取り込まれた場合にも依然として自己探知出来る。

本発明の実施にかかりそして上記したように一般式 P-S-B-Sigによって記述されもしくは定義される特殊なヌクレオチドはまた該Sig化学部分はB部分がアデニンもしくははN⁺または2-アミノ基位置の場合、B部分がグアニンもしくははN⁺もしくはは4-アミノ基位置の場合、B部分がシトシンの場合にはN⁺もしくはは6-アミノ基位置においてB部分に共有結合せられるヌクレオチドを含むことが指摘される。結合された該Sig部分を含む結果として得られたヌクレオチドはそれ自体が信号することが出来るかもしくはそれ自体が自己探知できるかもしくははその存在が知られ得、そして検知可能であり、二重鎖構造を有するDNAもしくははRNAもしくははDNA-RNAハイブリッドである。

概要として、本発明にかかる種々の特殊なヌクレオチ

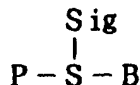
とくに興味あるものの中には、一般式



を有する該ヌクレオチドがある。

ここにPはモノー、ジー、トリー、もしくはテトラ燐酸エステルを含む燐酸部分、Sは蔗糖もしくはモノサッカライド部分、Bはプリンもしくはピリミジンのいずれかの塩基部分である。該燐酸部分は該ヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドの場合にはS部分の3'および/または5' - 位置に結合せられ、該ヌクレオチドがリボヌクレオチドの場合には2', 3' および/または5' 位置に結合せられる。該塩基B部分は該塩基がピリミジンもしくはプリンの場合にはS部分のN9位置から1' - 位置までそれぞれ結合せられる。そして該Sig部分は該ヌクレオチドの塩基B部分に共有結合せられる。そして該Sig部分はこのように結合せられる場合にはそれ自体が信号することが出来るかもしくはそれ自体が自己探知出来るかもしくはその存在が知られ得、そして望ましくはもしくは出来るならば、結果として得られたヌクレオチドP-S-B-Sigが二重鎖構造を有するDNAもしくはRNAもしくはDNA-RNAハイブリッドの中に取り込まれるようにかしくはそれらを形成せしめそして/またはそれらの上で検出可能にする。

本発明にかかる他の特殊な一般式



によって特徴づけられる。

本発明にかかるこのようなヌクレオチドはリボヌクレオチドとして特徴づけられるであろう。該磷酸部分は該蔗糖部分の2',3' および/または5'-位置に結合せられ、該塩基は該塩基がピリミジンもしくはプリンの場合には蔗糖S部分のN1位置もしくはN9位置から1'位置までそれぞれ結合せられる。該Sig化学部分は蔗糖S部分に共有結合せられ、そしてそれ自体が信号することが出来るかもしくはそれ自体が自己探知出来るかもしくはその存在が知られ得、そして出来るならばそれと関連する二重鎖構造を有するRNAもしくはでDNA-RNAハイブ

ドの構成に関しては上記に指示したように、該特殊なヌクレオチドは磷酸部分P、蔗糖部分Sそして塩基部分B、プリンもしくはピリミジンからなるとして説明されることが出来るが、P-S-Bの組み合わせはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドの両方のヌクレオチドに関係しそして定義するものとしてよく知られている。該ヌクレオチドはそれからP部分および/またはS部分および/またはB部分、化学部分Sig⁺へ共有結合したことによって本発明の実施による変性を受ける。このようなヌクレオチドP-S-Bに結合され化学部分Sig⁺は結果物たるヌクレオチドを与え得るかもしくは作成し得、かくのごとくSig⁺部分を有するP-S-Bから成る該ヌクレオチドは他の部分の一つもしくはそれ以上と結合され、ポリヌクレオチド、特に例えば二重鎖構造を有するDNA、二重鎖構造を有するDNA、もしくは二重鎖構造を有するDNA-RNAハイブリッドのような二重鎖構造を有するポリヌクレオチドの中へ取り込まれる時、自己探知するかもしくはそれ自体が信号するかもしくは本来知られたその存在をもたらしすることが出来る。該Sig⁺部分は望ましくは本発明にかかる特殊なSig⁺-含有ヌクレオチドを含む二重鎖構造を有するポリヌクレオチドを形成するための該ヌクレオチドの能力を妨げるべきでなく、そしてその中に取り込まれた時、Sig⁺-含有ヌクレオチドは検出、位置決定、もしくは観察することが可能である。

本発明の特殊なヌクレオチドの構成に用いられるSig⁺部分は例えばアルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、ホースラディッシュパーオキシダーゼ、もしくはリボヌクレアーゼのような酵素もしくは酵素物質からなり得るであろう。該Sig⁺部分または例えばフルオロセインもしくはローダミンもしくはダンシルのような蛍光性成分を含むことが出来るであろう。もし所望ならば該Sig⁺部分は例えば磁性酸化物もしくは磁性酸化鉄のようなそれに組み込まれもしくは結合される磁性成分を含むことが出来、それは磁気的手段によって検知し得るこのような磁気含有Sig⁺部分を含むヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドを作るであろう。該Sig⁺部分はまた観察が可能なような例えばフェリチンのような高電子密度成分を含むであろう。該Sig⁺部分はまた放射線検出手段によって観察可能な結果物であるヌクレオチドを作成する例えば放射性コバルトのような放射性同位元素成分を含むことも出来るであろう。該Sig⁺部分はまたハプテン成分を含むことが出来るかまたは本体それに対して特定の抗体と複合し得るであろう。最も有用なのは、該Sig⁺部分が例えばコンカナビリンAのようなレクチンのような蛋白質を結合している蔗糖もしくはポリサッカライドと複合するかもしくは結合されることが出来るポリサッカライドもしくはオリゴサッカライドもしくはモノサッカライドである。本発明にかかる特殊なヌクレオチドのSig⁺成分もしくは部分はまた化学ルミネセンス成分を含む

ことが出来る。

本発明の実施において述べられるように、該Sig⁺成分はヌクレオチドと例えばそれに含まれる塩基Bもしくは蔗糖S成分もしくは磷酸P成分において直接もしくは化学鎖もしくは連鎖腕を介して結合可能であるいかなる化学部分によっても構成される。

本発明にかかるヌクレオチドのSig⁺成分そして該Sig⁺成分を含む本発明のヌクレオチドを取り込むヌクレオチドおよびポリヌクレオチドは上記された米国特許出願第255,223号において記載されているヌクレオチドに相当しそれらと同様な目的のために有用である。更に明確には米国特許出願第255,223号に記載されている化学部分は本発明の特殊なヌクレオチドSig⁺成分もしくは化学部分と機能的に同等である。したがって本発明のヌクレオチドのSig⁺成分もしくは化学部分は、米国特許出願第255,223号にによって述べられているように米国特許出願第255,223号のヌクレオチドのBとAとを結ぶ点線によって示されているように直接P,SもしくはB部分に共有結合せしめられるかもしくは化学鎖もしくは連鎖腕を介して結合せしめられる。米国特許出願第255,223号において同定せられる種々の連鎖腕もしくは連鎖は本発明の特殊なヌクレオチドの調製に適用可能であり有用である。

本発明の特殊なヌクレオチドの特に重要なそして有用な面はDNAもしくはRNAプローブの調製におけるかようなヌクレオチド使用である。かようなプローブは位置に見出されるべきそして/または同定されるべき遺伝物質のDNAもしくはRNA連鎖と実質的に対になるヌクレオチド連鎖を含むであろう。該プローブは本発明の特殊なヌクレオチドの一つもしくはそれ以上を含むであろう。例えば一重鎖をなすポリヌクレオチド、DNAもしくはRNAプローブのいずれかのような所望のヌクレオチド連鎖を有するプローブにはそれから同定されるべきDNAもしくはRNA遺伝物質との接触がもたらされるであろう。該プローブの位置付けおよび該プローブと、同定されるべき対をなすDNAもしくはRNA物質を含む二重鎖構造を有するポリヌクレオチドの形成の上で結果として形成された二重鎖構造を有するDNAもしくはRNA含有物質はその後観察、可能でありそして同定されるであろう。本発明にかかるプローブは所望によって約5ヌクレオチドから約500もしくはそれ以上のいかなる個数のヌクレオチド単位を実質的に含むであろう。12個の対をなす、望ましくは連続したヌクレオチド単位は、もし該プローブの12個のヌクレオチド連鎖が調査せられもしくは同定されるべきDNAもしくはRNA物質中の相当する協同連鎖と対になるならば、調査されもしくは同定されるべきDNAもしくはRNAの殆どのものの同定に十分有効であろう。述べられたように、このようなプローブは本発明にかかる特殊なSig⁺-含有ヌクレオチドの一つもしくはそれ以上、望ましくは少なくともプローブ中のヌクレオチドの5~10個に対しておおよそ一個の特殊なヌクレオチドを含むであろう。

上記に引用されたPNAS論説中および1981年4月17日出願の米国特許出願第255,223号、1982年6月23日出願の同第391,440号及び米国特許第4,358,535号の開示はここに取り込まれかつ本開示の一部をなす。

本発明の実施によれば、非放射性の化学的にラベルされているポリヌクレオチドは例えば非放射性の化学的にラベルされている一重鎖をなすDNAプローブから調製される。このようなプローブは同定もしくは検出されるべき遺伝物質との接触をもたらされる。これらのプローブが同定もしくは調査されるべき遺伝物質との接触をもたらされる前に、遺伝物質は変性されて例えば該遺伝物質から誘導され一重鎖をなすDNAのような一重鎖をなす遺伝物質を生成もしくは形成する。望ましくは、得られた一重鎖をなす遺伝物質は例えばポリスチレンのようなプラスチック材料や望ましくはガラスのような透明もしくは半透明表面のような適当な不活性支持体もしくは表面に固定される。その上において、例えば本発明の特殊な非放射性の化学的にラベルされている一重鎖をなすDNAプローブのような特殊な非放射性の化学的にラベルされているプローブが、ハイブリッド化条件に下にてこのように固定された一重鎖をなす遺伝物質との接触をもたらされる。該プローブは例えばその構成において検出もしくは同定されるべき遺伝物質を構成する塩基と対をなす少なくとも約25個の塩基のように充分な個数を備えるように選択される。結果として得られる二重鎖構造もしくは二重構造の形状によって同定せられるべき一重鎖をなす遺伝物質に対するプローブのハイブリッド化は、その後結果として形成される二重鎖構造を有するハイブリッドもしくは二重構造ハイブリッドのプローブ部分に結合する非放射性の化学的なラベルによって検出されるであろう。該プローブの構成において用いられる非放射性の化学的ラベルによる種々の手法は該二重鎖構造もしくは二重構造を有するハイブリッドの形成を検出するために用いられるであろう。しかしながら本発明の実施においては、形成されるハイブリッドの検出のために分光測光手法および／または酵素結合免疫吸着剤検定（ELISA）手法を用いることが望ましい。分光測光およびELISA手法は結果として形成される二重鎖構造を有するハイブリッドの検出のみならず比色的もしくは蛍光測光的に測定され得る、例えば生成物の酵素的生成によるようなそれらの定量測定をも行うことができる。比色測定において、例えば抗体と結合せしめられているアルカリホスファターゼのような抗体結合酵素は非放射性の化学的にラベルされているプローブに結合せしめられそして比色的もしくは分光測光的に測定され得る生成物の酵素的生成に用いられるであろう。もう一つの適当な分光学的もしくは比色的手法は免疫蛍光を含み、該免疫蛍光においてはフルオレセインラベルされている抗体は構成に先立って用いられるか、もしくはハイブリッド形成およびフルオレセインラベルされている抗体が蛍光測光的に測定さ

れるプローブに結合されるかもしくは固定された後で非放射性の化学的ラベルに結合される。

上記に確認された定量的結果を与えることに加えて、分光測光的もしくは比色的手法はまた結果として形成される二重鎖構造を有するハイブリッドにおいて非放射性の化学的ラベルのかかなり迅速な可視的証明もしくは引出しを有用に与える。他のELISAに似たもしくはそれと関連する手法はまた形成される二重構造中の非放射性の化学的ラベルの検出にとって有用であり、かような他の手法にはまた例えば免疫バеоキシダーゼのような酵素の使用、例えば免疫フニリチンのような高電子密度のマーカー、もしくはプローブと結合が可能もしくは結合されている他の化学的および／または物理的マーカーの使用が含まれる。概して、本発明の実施はハイブリッド形成の定性的のみならず定量的測定としての酵素結合免疫吸着剤検定と類似の手法を提供する。

述べられたように、例えば非放射性の化学的にラベルされたDNAプローブと、同定されるべき変性された遺伝DNA物質から誘導された実質的にそれと対をなす遺伝DNA物質とによって形成される二重構造もしくはハイブリッドのような結果として形成される二重鎖構造を有するかもしくはハイブリッド化された物質中の該非放射性の化学的ラベルされているプローブを定性的もしくは定量的に表現もしくは表示することに効果があるかもしくはそれらをもたらすためにELISA手法を用いることが望ましい。本発明にかかる望ましいELISA手法において、同定されるべきDNA物質を変性して一重鎖をなすDNA物質を形成した後、例えばDNAのような一重鎖をなす遺伝物質が基材に固定される。本発明の実施においては、基材は例えばガラス基材もしくは表面のように透明な基材であることが望ましい。一重鎖をなすDNA物質が固定されそしてハイブリッド化されている例えばガラス基材のような透明基材を用いることにより、該ELISA手法は同定されるべきDNA物質の定性的および定量的測定を提供する。該DNA物質が固定されている透明な基材を用いることによって、本発明の実施に適用される該ELISA手法の利益と広範囲な適用性の完全な達成を得ることが出来る。

酵素等を珪酸系物質に固定すること、そして酵素、抗体および抗原としてのこのような物質を例えば珪酸系基体のような種々の基体に結合することを含んだ抗体等の検出を行うことが知られている。例えば米国特許第3,669,841号、第3,715,278号、第3,949,064号、第4,001,583号、第4,059,685号、第4,120,945号および第4,280,992号をみよ。

本発明に実施において、同定せられるべきDNA物質から誘導される変性された一重鎖をなす遺伝DNA物質の固定は例えばガラス表面のような透明基材のような基材に急速に固定される。透明ガラス基材に対する一重鎖をなすDNA物質の急速固定はELISA手法を含む多数の試料の急速な試験を可能ならしめる。例えば、その中の凹部もし

くはウェルの配列を備えたガラス板はその中に載置される同定されるべき種々な変性された遺伝物質および該ウェル表面に固定された該一重鎖をなすDNA物質の試料を有するであろう。その上に非放射性的の化学的ラベルを備えたDNAプローブはその中のいかなる対になる一重鎖をなすDNA物質とハイブリッド化するためのウェルの各々の中に載置される。ハイブリッド化されなかったいかなるプローブをも洗浄して除去した後、同定されるべき一重鎖をなすDNA物質と非放射性的の化学的にラベルされているプローブとを含むいかなるハイブリッドDNA物質の存在をもここに述べられるように該プローブの化学的ラベルに結合するために酵素が結合されている抗体もしくは他の適当な物質を添加することを含んだ検出が行われる。続いて適当な基質が色調変化もしくは化学反応を引き出すために添加せられ、これら色調変化もしくは化学反応はその後比色的もしくは光学的に測定され得るであろう。

例えば変性された一重鎖をなすDNAのようなDNA物質のガラスに対する急速固定を行わしめるために、該ガラスは例えば珪酸ガラスのようなガラスを例えば5%程度の薄い硝酸水溶液の存在下で、例えば約45分程度の十分な時間加熱もしくは煮沸することによって調製されるかもしくは前処理され。この硝酸による前処理はガラス表面から珪素残渣を溶かして除去するものである。該処理されたガラスはそれから水、望ましくは蒸留水によって洗浄もしくは浸漬され、そして例えば約115°Cの温度で約24時間乾燥される。蒸留水中に溶かされ、次いで6N塩酸を添加してpHを約3.45にしたガンマーアミノプロピルトリエトキシシランの10%溶液はその後ガラス表面に塗布され、そして該ガラス表面は上記シラン溶液と約45°Cの温度で約2〜3時間接触せしめられることによってインキュベートされる。該ガラス表面はその後等量の水で洗浄されそして約100°Cの温度で一晩乾燥される。このように処理されたガラス表面は、それに塗布されているいかなる負に荷電されている高分子電解質を不動化もしくは固定するのに適するその表面上に与えられる有効なアルキルアミンを有する。上記に関連してはWeetal, H. H.およびFilbert, A.M.の「親和性クロマトグラフの応用に対する多孔質ガラス」、酵素学における方法、Vol. XX XIV, 酵素浄化の親和技術: Part B, pp. 59-72, W.B. Jakoby 及びM. Wilchek編を参照のこと。

本発明の実施を説明するために、種々のDNA物質が調製される。例えばバクテリオファージT4 DNAはファージT4AM82 [44' 62'] によって感染されているE. coli CR63から単離されそして染色体DNAから離れるように精製される。高度に精製された仔牛胸腺DNAは生物学的供給作業から得られた。バクテリアファージラムダは γ C₈₅₇ファージに対する溶原性E. coli 種族W3350の熱誘導によって得られ、ファージラムダDNAの調製のための用いられる。また放射性的のDNAは [³H] dATPによる遷移翻訳に

によって調製されそしてファージラムダDNAはまたマルトーストリオースdUTPによって遷移翻訳されて該DNA中にグルコシルもしくはサッカライドを導入する。例えばグルコシル基とコンプレックスを容易かつ簡単に形成するレクチンのような他の試薬が得られもしくは調製される。特にコンカナバリンA [Con A] が得られそして50mg/mlの濃度で2.0M NaCl中において可溶化せしめられる。またフルオレセインラベルされているCon Aは0.1M硝酸ソーダ溶液中でFITC対蛋白質3モル比で、pH9.2で、温度37°Cにおいて60分間Con Aをフルオレセインイソチオシアナートと反応せしめることによって調製される。いかなる未反応FITCもセファデックスG-50中のゲル濾過によって除去される。

上記のごとくして処理されたガラス表面はグルコシル化DNAに対するレクチン結合の検出において用いられる。この方法ではグルコシル化DNA [T4 DNA] もしくは非グルコシル化DNA [仔牛胸腺DNA] は100 μ l 部分で三組の処理されたガラスチューブに投入される。室温にて15〜30分後、該溶液は取り除かれそして該チューブはPB S \cdot Mg²⁺ バッファー [100mM Na-K-PO₄, pH6.5, 150mM NaClおよび10mM MgCl₂] に十分浸漬される。チューブの一组はエチジウムブロマイドで染色することによって [1mg/ml溶液の100 μ l, 暗所で30分, 室温]、DNAの存在を確認された。該染色溶液は除去されそしてチューブはすすぎ洗われ、そして紫外線下で確認された。チューブの他の組に対して、フルオレセントラベルされているCon A [0.1mg/ml PBS \cdot Mg²⁺ バッファー] が投入された。室温60分後、該溶液は除去されそして該チューブはすすぎ洗われそして紫外線下で確認された。

チューブの三組目に対してPBS \cdot Mg²⁺ バッファー中のラベルされていないCon A 100mlが投入された。室温で60分後、該チューブは0.2MイニダゾールバッファーpH6.5によってすすぎ洗われてCon Aから離された。

酸ホスファターゼがその後添加され [0.2%のホスファターゼを含まないBSAにおいて100 μ l 中で0.005単位]、そして該チューブは室温で30分間インキュベーションされた。0.15M NaClによるすすぎ洗いの後 (いかなる結合されていない酵素をも除去するために)、基質 [0.2Mイニダゾール中パラニトロフェニルホスフェイト 0.1mM, pH6.5] が添加せられそしてインキュベーションは37°Cで60分継続された。該酵素反応は0.5%の重炭酸ソーダの1.0mlを添加することによって終結せしめられそしてA300で吸光度が測定される。

結果として観察された試験結果はエチジウムブロマイドの赤色蛍光特性を観察することによってグルコシル化およびグルコシル化されないDNAが活性化ガラス表面に結合していることを示した。またT4 DNAを含むチューブでは緑色蛍光によって確認されるようにCon Aは只グルコシル化DNAにのみ結合するが、仔牛胸腺DNAを有するチューブでは結合しない。更にグリコプロティンである酸

ホスファターゼはT4 DNAおよびCon Aを含むチューブでは陽性反応を与えるが、Con AのみもしくはCon Aと仔牛胸腺DNAを含むチューブからは洗い落とされてしまう。

活性化ガラスチューブはまたガラス表面上に既に不動化されたDNAに対してハイブリッド化されたグルコシル化DNAプローブに対するレクチン結合の検出にも用いられる。これらの試験において、ファージラムダDNAはガラス表面上に不動化された。バッファーによるすすぎ洗いの後、該チューブは42°Cで90〜120分間100μgのコートティング溶液〔50%ホルムアミド、5XSSC、100μg 鮭精子DNA、0.2%ポリビニルピロリドン、0.1トライトンX-100、0.2%BSAおよび0.05%SDS〕によって被覆された。該コートティング溶液は除去されそして該表面はグルコシル化遷移翻訳されたDNAプローブを含むコートティング溶液の100μlで被覆された。該プローブは80°C3分間変性されそして使用前に直ちに氷浴によって急速に冷却された。該チューブはその後42°C24時間インキュベーションされた。該溶液は除去されそしてチューブはPBS・Mg⁺⁺バッファーによってすすぎ洗われた。該レクチン-酵素検出システムは上に述べたように投入された。結果は酸ホスファターゼはグルコシル化DNAプローブを含むチューブから洗い落とされないがグルコシル化されていないプローブを含むチューブはいかなる酵素活性をも示さない。これら試験において、該グルコシル化DNAプローブのグルコシル(モノサッカライド)部分は非放射性の化学的ラベルの役割を果たしレクチン、Con Aと反応するかもしれない強固に引きつけてレクチン-酵素(酸ホスファターゼ)結合プローブ検出システムを構成する。

該グルコシル化DNAプローブのグルコシルもしくはモノサッカライド部分が非放射性の化学的ラベルの役割を果たすグルコシル化DNAをプローブとして用いる上記試験において、比較出来る結果はまだビオチンラベルされているDNAプローブを用いる本発明の実施において成し遂げられる。ビオチンがDNAプローブの非放射性の化学的ラベルとして用いられる時、そしてアビジンがビオチンと強力に反応するかもしれない強固に結合するので、該ビオチンラベルされているDNAプローブの存在はアビジンもしくはストレプトアビジンラベルされている酵素によって明らかにされるかもしれない検出されるであろう。例えばビオチンラベルされているDNAプローブはアビジン-ビオチン-アルカリホスファターゼの特性の酵素コンプレックスによって迅速に検出されるであろう。より特別には、該ビオチンラベルされているDNAプローブの存在はビオチンラベルされているプローブを含んでいるハイブリッドを酵素コンプレックスアビジン-ビオチン-アルカリホスファターゼに接触させ、次いでそれへ該アビジン-ビオチン-アルカリホスファターゼコンプレックスを結合した結果として得られたビオチンラベルされているDNAプローブを、アルカリホスファターゼによって引き起こされる色調反応もしくは沈澱によってELISA

手法における光学および/または比色測定を用いて定性的そして定量的に容易に認識もしくは測定され得る適当な基材との接触をもたされる。もし所望ならば、アビジン-ビオチン-酵素コンプレックスの代わりに、ビオチンラベルされているDNAプローブのビオチン部分に結合させるためにビオチンに対して抗体が用いられることが出来、次いで上記方法において抗-抗体-酵素からなるコンプレックスが形成される。

本発明の実施例の利点はまた該DNAプローブが例えばポリスチレン表面のようなプラスチック表面に対して固定もしくはハイブリッド化せしめられる際に得られることが出来る。プラスチック表面が用いられる際、非放射性の化学的にラベルされているDNAプローブを含むそこへ塗布されるDNAの固定の有効性もしくは均一性を向上せしめるために、例えばポリスチレン表面のようなプラスチック表面を処理して例えば一重鎖をなす変性されたDNAもしくは非放射性の化学的にラベルされているプローブもしくは該DNAプローブを含むハイブリッドDNAのようなその上の遺伝物質の固定もしくは不動化を増進せしめ、さもなくば改良することが時により望ましい。例えば、ポリスチレン表面に対するDNAの接着もしくは固定は上記したように例えばデュオデカジアミンのようなアミノ置換疎水性重合体によって表面を処理することにより改良される。DNAを固定するためにプラスチック表面の固定もしくは均一性を改良するための他の手法はポリリシン(PPL)による表面の処理を含む。

DNAをプラスチック表面に対して固定することを含む試験において、ビオチン化されたDNAは変性されそしてダイナテック、イムロンII[®]の移動可能なウェルの中へ割り当てられる。試料は37°Cでプラスチック表面上で乾燥せしめられる。結合されたb-DNAの量はアルカリホスファターゼとコンプレックスを形成しているヤギ抗-ビオチン抗体およびウサギ抗-ヤギ抗体を連続的に添加し、次いでpH9.6のジエタノールアミンバッファー中においてp-ニトロフェニルホスフェイトによって展開することにより測定される。酵素活性は自動ダイナテックマイクロELISAスキャナーを用いて405nmにて監視された。この方法は研究者に結合されたDNAの量を測定することを可能ならしめ、そしてビオチン化の程度に慎重に測定することを可能ならしめる。

検出の感度を向上するために例えば4-メチルウンベリフェリルホスフェイトのような蛍光遺伝因子の基材もしくはその類似物が同伴酵素と共に用いられるであろう。

変性されたアデノウィルス2DNAを幾らかに分割して上記されたようにポリスチレン板に結合された追加の試験で行われた。デンハートのホルムアミドブロッキングバッファーでブロッキングした後、幾らかビオチン化されているプローブが不動化されたDNAにハイブリッド化された。これらはB-アデノ-2-DNAおよびγDNAであっ

た。不動化されたDNAの一つの組に対してはプローブは添加されなかった。ハイブリッド化の範囲は上記したように抗体酵素反応によって測定された。相応するアデノ-2プローブのみがハイブリッド化されていることが観察された。この手法はこれらの条件下での試験管的ハイブリッド化が特有なものであり定量的に観察され得ることを示している。

種々の組もしくはソースからのポリスチレンには異なった結合能力が存する。先の実験はデオデカジアミン(DDA)をポリスチレンに添加することは異なった組の

更なる試験において、変性された放射性等されているヒオチニル化されていないDNAはDDA被覆ポリスチレン板に対して塗布された。該試験試料もしくは板は乾燥されなかった。37°Cで30分、1時間、2時間、3時間、4時間、そして18時間のインキュベーションの後、試料は計数されなかった。結合は2時間のインキュベーション後に最大であった。しかしながら50%の初めから塗布されているDNAは濃度に関係なく結合され、その事実によって結合および非結合DNA間には平衡が存在することが認められた。

他の試験においては、ポリスチレンマイクロフィルタールウェルはFilipssonとHornbyの方法[Biochem J.120 215 (1970)]を用いて硝化された。該ポリスチレンウェルは濃硝酸と濃硫酸[41%v/v]の混合液中に20分間浸漬され0°Cに冷却された。該ウェルはそれから水で完全に洗浄され次いで2M苛性カリ中亜ニチオン酸ナトリウム6%溶液中で70°Cに加熱された。4時間後、該ウェルは0.5M塩酸および蒸留水で完全に洗浄された。

6-アミノヘキサミンが結合されたポリスチレンを製造するために、6-アミノカブロン酸N-ヒドロキシサクシンイミドエステル・ヒドロプロマイド[6-アミノカブロン酸・ヒドロプロマイドを、N-ヒドロキシサクシンイミドおよびジシクロヘキシルカルボジイミドとでジメチルホルムアミド中に反応させそしてイソプロピルアルコールから再結晶させることにより得られた0.2Mジメチルホルムアミド中に5mg溶解されている溶液]が0.1M硼酸ソーダ[0.4ml]に添加された。この溶液を充たしたアミノ変性ポリスチレンマイクロフィルタールウェル

は4時間室温で反応せしめられ、そして蒸留水で完全に洗浄された。その結果得られた処理されたウェルはpH9.5以下において水溶液から³HラベルされているDNAを吸着した。

上記したように、ガラス基材のような珪酸系基材、およびポリスチレン基材のようなプラスチック基材はエポキシ樹脂の塗膜で処理することもしくは該塗膜をその上に設けることによってDNAの固定もしくは、不動化の能力に関して改良される。例えばガラスおよびポリスチレン表面は例えばエポキシ接着剤のエタノール溶液[1% w/v]のような市販のエポキシ接着剤でガラスもしくはポリスチレン表面を処理することによってその上のDNAの固定もしくは不動化に関して改良される。これらエポキシ溶液はバイレックスガラスのようなガラス表面もしくはポリスチレン表面もしくはウェルに塗布され、それから溶剤(エタノール)が37°Cの温度で蒸発せられ、それによってかくして処理された表面上にポリアミド重合体塗膜を与える。これら表面はpH9.5以下において水溶液から³HラベルされているDNAを吸着することが見出された。

ハイブリッド化プローブの比色もしくは光学的測定のためのELISAのような手法に関して上記された方法は、基質もしくは沈澱において色調変化を生ずる酵素結合試薬を含む。酵素と色調発現基質の種々な組み合わせが用いられる。例えば酵素とクロモゲンの組み合わせを示す添付された表、第I表および第II表を参照されたい。第I表においては、基質中に見出されるクロモゲンは非放射性的の化学的にラベルされているプローブの存在を明らかにするもしくは測定するために用いられる酵素と反応可能である。上付きの符号(F)は蛍光を発するクロモゲンであることを示す。第II表においては、例えばアビジン/ストレプトアビジンシステムにより用いられる時のように不溶性生成物を生成するこれらクロモゲンが記載されている。これら酵素-クロモゲンの組み合わせは本発明にかかる特殊な非放射性的の化学的にラベルされているプローブを含むハイブリッドDNAもしくは他の遺伝物質の定性的および定量的な測定のためのELISA手法において特に有用である。

第 I 表

ク ロ モ ゲ ン

酵 素

- | | | |
|---|---------------------|--|
| 1 | a. アルカリ ホスファターゼ | 4-メチルウンベリフェリル ホスファターゼ ^(f) |
| | b. アシド ホスファターゼ | ビス(4-メチルウンベリフェリル ホスファターゼ) ^(f) |
| | | 3-O-メチルフルオレセイン |
| | | フラボン-3-ジホスフェート トリアンモニウム ^(f) 塩 |
| | | p-ニトロフェニル ホスフェート 2Na. |
| 2 | ペロキシダーゼ | チラミン ハイドロクロライト ^(f) |
| | | 3-(p-ハイドロキシフェニル)プロピオン酸 ^(f) |
| | | p-ハイドロキシフェネチル アルコール ^(f) |
| | | 2, 2'-アジノージ-3-エチルベンチアゾリン
スルホン酸(ABTS) |
| | | オルト-フェニレンジアミン 2HCl |
| | | 0-ジアニシジン |
| | | 5-アミノサリチル酸 |
| | | p-クレゾール ^(f) |
| | | 3, 3'-ジメチルオキシベンジジン |
| | | 3-メチル-2-ベンゾチアゾリン ハイドラゾン |
| | | テトラメチル ベンジジン |
| 3 | β -D-ガラクトシダーゼ | 0-ニトロフェニル β -D-ガラクトピラノシド |
| | | 4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド |
| 4 | グルコース-オキシダーゼ | ABTS |

第 II 表

クロモゲン (不溶性生成物)

酵 素

- | | | |
|---|----------------------|---|
| 1 | アルカリ ホスフェート | 6-ブロモ-3-ヒドロキシ-2-ナフチル-0
アニシジン + 定着 バイオレット B 塩
2,2'-ジメチル-3-ヒドロキシ-2-ナフタニリド
+ 定着 レッド 塩
フラボン-3-ジホスフェート アンモニウム
塩 + $AlCl_3$ (R)
5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート
+ テトラゾリウム, ニトロ BT. |
| 2 | ホースラディッシュ
ペロキシダーゼ | H_2O_2 + ジアミノベンジジン
H_2O_2 + テトラメチルベンジジン |
| 3 | グルコース オキシダーゼ | グルコース + シアゾリル ブルー |
| 4 | β -ガラクトシダーゼ | 2-(β -D-ガラクトシドオキシ) ナフトール
AS-LC + 定着 バイオレット B 塩
ナフトール-AS-B1-B-0-ガラクトピラノシド
+ 定着 ブルー BBN 塩 |

上述の開示に照らして述べられた技術で明らかなよう *き換えが可能であり、これらは本願の精神及び範囲から
に、本願の実施にあたっては多くの変更、改変および置* 離れるものではない。

フロントページの続き

(72)発明者 ドリー カーティカー
 アメリカ合衆国 11373 ニューヨーク
 エルムハースト, ストリート 80 .42
 -72

(72)発明者 ケネス エイチ, ジョンストン
 アメリカ合衆国 10014 ニューヨーク
 ニューヨーク, ホレーショ ストリート 95

(72)発明者 バーバラ イー, サレンフェルド
 アメリカ合衆国 10016 ニューヨーク
 ニューヨーク, ストリート 39 イースト 250

【公報種別】特許公報の訂正

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成11年（1999）6月2日

【特許番号】第2825090号

【登録日】平成10年（1998）9月11日

【特許公報発行日】平成10年（1998）11月18日

【年通号数】特許公報10-54

【出願番号】特願昭59-14165

【訂正要旨】優先日誤載につき下記の通り全文を訂正する。

【国際特許分類第6版】

C12Q 1/68

【F I】

C12Q 1/68 A

【記】別紙のとおり